

## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ИЗОМЕРОВ В СУБСТАНЦИИ И ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ ПРЕПАРАТА ЛИЗОМУСТИН МЕТОДОМ ВЭЖХ

А.Н.Гришаков, Т.И.Клочкова\*, Г.Л.Левит, В.П.Краснов, Л.Б.Радина, О.Н.Чупахин

Институт органического синтеза УрО РАН  
620219, Екатеринбург, ГСП-147, С.Ковалевской, 20

E-mail: ca@ios.uran.ru.

\* Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина РАМН,  
115478, Москва, Каширское ш., 24

Поступила в редакцию 24 апреля 2001 г.

Разработан метод анализа изомерного состава нового противоопухолевого препарата лизомустин, основанный на использовании высокоэффективной жидкостной хроматографии в обращеннофазовом варианте на отечественном микроколоночном хроматографе "Милихром". Относительная ошибка метода не превышает 2%, что позволило его использовать при составлении фармакопейных статей на субстанцию и лекарственную форму препарата.

**Гришаков Александр Николаевич** - кандидат химических наук, старший научный сотрудник Института органического синтеза УрО РАН.

Область научных интересов: жидкостная хроматография органических соединений.

Автор 48 публикаций.

**Клочкова Татьяна Ивановна** - кандидат фармацевтических наук, ведущий научный сотрудник Российского онкологического центра им. Н.Н.Блохина РАМН.

Область научных интересов: фармацевтический анализ, синтез лекарственных соединений.

Автор более 20 печатных работ.

**Левит Галина Львовна** - кандидат химических наук, старший научный сотрудник Института органического синтеза УрО РАН.

Область научных интересов: синтез и исследование физиологически активных соединений.

Автор более 30 печатных работ.

**Краснов Виктор Павлович** - доктор химических наук, старший научный сотрудник,

заведующий лабораторией химии аминокислот Института органического синтеза УрО РАН.

Область научных интересов: синтез и исследование физиологически активных соединений, стереохимия.

Автор более 150 печатных работ.

**Радина Лия Борисовна** - кандидат химических наук, старший научный сотрудник Института органического синтеза УрО РАН.

Область научных интересов: анализ и исследование физиологически активных соединений.

Автор более 40 печатных работ.

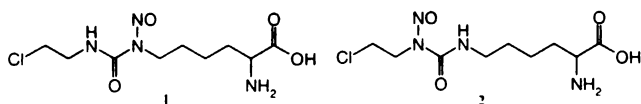
**Чупахин Олег Николаевич** - доктор химических наук, профессор, академик РАН, директор Института органического синтеза УрО РАН.

Область научных интересов: теоретическая органическая химия, синтез и исследование физиологически активных соединений.

Автор более 500 печатных работ, 10 монографий

Лизомустин – новый противоопухолевый препарат из группы нитрозоалкил-мочевин (НАМ), который представляет собой смесь изомеров положе-

ния нитрозогруппы: 9-(2-хлорэтил)-7-нитрозо-L-гомоцитруллин (**1**) и 9-(2-хлорэтил)-9-нитрозо-L-гомоцитруллин (**2**) со структурными формулами:



Исследование биологической активности индивидуальных изомеров лизомустина [1] показало, что изомер **2** проявляет значительно более высокий противоопухолевый эффект по сравнению с изомером **1**, т.е. лечебное действие препарата лизомустин зависит от содержания изомера **2**. Изучение противоопухолевой активности индивидуальных изомеров лизомустина и их смеси позволило сделать заключение о том, что смесь изомеров лизомустина обладает лучшими терапевтическими свойствами по сравнению с изомером **2**. Установлено, что оптимальным соотношением изомеров в препарате является следующее: 25 % изомера **2** и 75 % изомера **1** с допустимым колебанием  $\pm 2$  % [1]. В связи с тем, что изомеры лизомустина отличаются друг от друга по противоопухолевому эффекту и токсичности, изомерный состав препарата является важнейшим показателем его качества.

Электронные спектры НАМ характеризуются двумя максимумами поглощения: коротковолновым – около 230 нм и длинноволновым – около 400 нм. Измерение поглощения растворов НАМ в этих областях положено в основу ряда методов определения НАМ [2]. Спектрофотометрические методы определения НАМ не обладают структурной избирательностью и не пригодны для анализа изомерного состава. Наибольшее распространение для целей определения индивидуальных соединений в сложных смесях получили хроматографические методы, например хроматография в тонком слое сорбента [3]. Однако чувствительность, и особенно точность этого метода является недостаточной для определения изомерного состава лизомустина. Для анализа количественного содержания нелетучих, термически неустойчивых органических соединений, к которым относятся НАМ, наиболее приемлемым является метод ВЭЖХ. Наличие в структуре изомеров лизомустина реакционноспособных и высокополярных групп ограничивало возможность использования неподвижных фаз и потребовало тщательного подбора состава элюента для достижения требуемой селективности разделения и сохранения исходного соотношения изомеров в процессе анализа.

### Экспериментальная часть

**Применяемые приборы и реактивы.** Для разработки методики определения изомерного со-

става использовали индивидуальные изомеры лизомустина, полученные по методу [1], и субстанцию лизомустина, содержащую не менее 98 % основного вещества, которая соответствовала требованиям Фармакопейной статьи [4].

Растворы препарата, вводимые в хроматографическую колонку, готовили на очищенной воде, соответствующей требованиям ФС 42-2620-97.

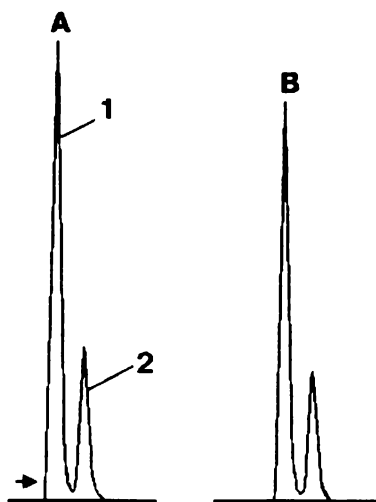
Реактивы, используемые для приготовления подвижной фазы, подвергали следующей обработке: спирт этиловый 95 % (ФС 42-3072-94) дополнительно перегоняли: калия фосфат однозамещенный ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , осч. 6-3ТУ 6-09-138-75) дважды перекристаллизовывали из воды и высушивали при  $110^\circ\text{C}$  до постоянной массы.

Хроматографический анализ проводили на микроколоночном хроматографе "Милихром" (Россия) с УФ спектрофотометрическим детектором. Длина колонки 62 мм, внутренний диаметр 2 мм, адсорбент - "Силасорб С18" (Чехия) с размером частиц 5 мкм, эффективность 1200-1500 т.т. Хроматограммы регистрировались на самопишущем потенциометре ЛКС4-003.

**Методика анализа.** 0.025 г (точная навеска) мелкорастертого лизомустина-субстанции переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, колбу заполняют водой до метки и тщательно перемешивают до полного растворения препарата (в случае лекарственной формы лизомустина содержимое одного флакона растворяют в мерной колбе вместимостью 100 мл). 1.0-1.5 мкл полученного раствора вводят в колонку аналитического хроматографа "Милихром" (Россия). Подвижная фаза - смесь спирта этилового 95 % и 0.01 М водного раствора  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  в соотношении 1:9 (по объему). Скорость подачи подвижной фазы 100 мкл/мин. Температура колонки - комнатная. Детектирование проводят при длине волны 230 нм. После каждого определения колонку промывают 1 мл спирта этилового 95 % и уравнивают подвижной фазой.

### Обсуждение результатов

В найденных условиях проведения анализа на хроматограмме препарат дает два пика (см. рисунок), отнесение которых было проведено по временам удерживания индивидуальных изомеров, соотношение площадей пиков соответствует соотношению изомеров в препарате. Площади пиков изомеров  $S_1$  и  $S_2$  (время выхода 3.8-4.2 мин и 4.9-5.2 мин, соответственно) определяют как произведение высоты пика на ширину на уровне половины его высоты [5].



Хроматограммы изомеров 1 и 2 лизомустина в субстанции (А) и лекарственной форме (В)

Содержание изомера 2 в препарате ( $X_2$ , %) вычисляют по формуле

$$X_2 = \frac{S_2 \cdot X}{S_1 + S_2}$$

где  $X$  - содержание основного вещества в образце препарата, %.

Результаты анализа двух партий субстанции лизомустина и некоторые статистические данные приведены в таблице. Относительная погрешность среднего результата ( $\epsilon$ ) не превышает 2,0%. Содержание изомера 2 в исследованных образцах субстанции составляет около 25%, что соответствует требованиям Фармакопейной статьи на субстанцию препарата (от 23,0% до 26,0%) [4].

Данная методика определения изомеров лизомустина использована в анализе его лекарственной формы, разработанной в РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН и содержащей, кроме субстанции полиглокин (или декстран М), и лимонную кислоту. Показано, что наличие этих веществ не мешает определению изомерного состава.

Результаты определения содержания изомера 2 в субстанции и лекарственной форме лизомустина ( $P=0.95$ )

Образец препарата	Содержание изомера 2, %	Относительная погрешность, %	n
Субстанция лизомустина, серия 7250496 (содержание основного вещества 98,27 %)	25,20	1,9	7
Субстанция лизомустина, серия 7311296 (содержание основного вещества 98,89 %)	24,40	2,0	8
Лизомустин лиофилизированный, серия 401294	24,09	1,6	5

### Выводы

Разработана методика определения содержания изомеров противоопухолевого препарата ли-

зомустин методом ВЭЖХ, позволяющая определять содержание изомеров в субстанции и лекарственной форме препарата.

### ЛИТЕРАТУРА

1. N"-Алкилнитрозокарбамоил- $\alpha, \omega$ -диаминокарбоновые кислоты. III Синтез и противоопухолевая активность N'-нитрозо-N'-[N'-(2-хлорэтил)карбамоил]-L-лизина и N'-[N'-(2-хлорэтил)-N'-нитрозокарбамоил]-L-лизина / Г.Л.Левит, В.П.Краснов, Л.Б.Радица и др. // Хим.-фарм. журнал. 1996. № 5. С.23-25.
2. Garrett E.R., Goto S., Stibbins J.F. Kinetics of solvolyses of various N-alkyl-N-nitrosoureas in neutral and alkaline solutions // J. Pharm. Sci. 1965. V.54, № 1. P.119-123.
3. Mirvish S.S., Chu C. Chemical determination of

- methylnitrosourea and ethyl-nitrosourea in stomach contents of rats, after incubation of the alrylureas plus sodium nitrite // J. Nat. Cancer Inst. 1973. V.50, № 3. P.745-50.
4. Стандарт качества лекарственного средства. Фармакопейная статья предприятия 42-0120029100. МЗ РФ, 2000. 10 с.
5. Аналитическая хроматография / К.И.Сакодинский, В.В.Бражников, С.А.Волков, В.Ю.Зельвенский, Э.С.Ганкина, В.Д.Шатц. М.: Химия, 1993. 464 с.

\* \* \* \* \*